



## Radiossensibilidade Gama de Extrato de *Maytenus ilicifolia*: Desenvolvimento de Protocolo para Controle de Qualidade

Ralph Santos OLIVEIRA <sup>1\*</sup> & Waldecir COLAÇO <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Comissão Nacional de Energia Nuclear/Centro Regional de Ciências Nucleares.  
Av. Prof. Luiz Freire, 200, Cidade Universitária, Recife-PE. Cep: 50740-540, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco/Departamento de Energia Nuclear. Av. Prof. Moraes Rego,  
1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, Brasil

**RESUMO.** Utilizou-se neste trabalho a radiação gama em matrizes fitoterápicas (extrato de *Maytenus ilicifolia*) para o controle de qualidade microbiológico destas matrizes, para tanto usou-se doses que variam de 1-10 KGy. Os resultados apontam para uma contribuição positiva da radiação gama no controle de qualidade microbiológico de matrizes fitoterápicas, em particular da *Maytenus ilicifolia*.

**SUMMARY.** "Gamma Radiosensitivity of *Maytenus ilicifolia* Extract: Development of Protocol for Quality Control". The present study discusses the contribution of the adoption gamma radiation applied to the microbiological quality control of phytotherapeutic matrices using the *Maytenus ilicifolia* extract as a model, for that were used doses from 1 to 10 KGy. Results indicated a positive contribution of gamma radiation to the microbiological quality control of *Maytenus ilicifolia*.

### INTRODUÇÃO

*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek é conhecida popularmente como "espinheira-santa", "cancerosa", "cancerosa-de-sete-espinhos" e "maiteno", dentre outros nomes <sup>1</sup>. Pertence à família Celastraceae, possuindo 55 gêneros e 850 espécies espalhadas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo <sup>2</sup>. No contexto brasileiro, onde seu crescimento é nativo, a espécie *M. ilicifolia* M. é largamente utilizada na medicina popular <sup>2</sup>. O uso medicinal de *Maytenus ilicifolia* é datado da década de 20, desde quando se tem algum registro escrito de sua utilização <sup>3</sup>.

A utilização de técnicas nucleares em processos de esterilização data de muito tempo. Em 1903, demonstrou-se o poder esterilizante dos Raios X. Anos antes, Pierre Curie e Becquerel haviam demonstrado, separadamente, o poder bactericida dos raios gama <sup>4</sup>.

O uso de técnicas nucleares aplicadas à agricultura não é recente no Brasil. Há alguns anos, várias instituições de pesquisas vêm buscando, com o uso intensivo dessas ferramentas, entender melhor a dinâmica dos solos e a movimen-

tação na natureza dos principais nutrientes das plantas, além de controlar pragas e moscas de plantações, melhorar a carga genética de determinadas culturas para aumentar a produtividade, e esterilizar alimentos para sua maior conservação <sup>5</sup>.

Normalmente, após serem colhidas, as plantas são colocadas ao sol ou em estufas para secagem, onde podem sofrer contaminação por insetos, bactérias e fungos, além de apresentar uma carga microbiana acima dos níveis considerados aceitáveis pelos órgãos de vigilância sanitária. O processo de irradiação tem se mostrado como o mais adequado para esterilizar esses produtos, uma vez que não aumenta a sua temperatura, durante o tratamento, como acontece com os processos térmicos. Uma outra alternativa para o processamento a frio, é a utilização do óxido de etileno. Essa, entretanto, foi proibida pelos Ministérios da Saúde e do Trabalho e Emprego <sup>6</sup>.

A irradiação de alimentos e plantas é um processo físico de tratamento comparável à pasteurização térmica, ao congelamento ou ao en-

**PALAVRAS CHAVE:** Plantas medicinais, Controle de qualidade, Controle microbiológico.

**KEY WORDS:** Medicinal plants, Quality control, Microbiological control.

\* Autor a quem correspondência deve ser enviada: Email: roliveira@cnen.gov.br

latamento. O processo envolve a exposição do alimento ou planta, embalado ou não, a um dos três tipos de energia ionizante: raios gama, raios X ou feixe de elétrons. Isto é feito em uma sala ou câmara especial de processamento por um tempo determinado. A fonte mais comum de raios gama, para processamento de alimentos ou plantas, é o radioisótopo Cobalto-60. Ao penetrar no alimento ou planta, a radiação elimina bactérias patogênicas, destruindo fungos, parasitas e insetos <sup>5</sup>.

As radiações ionizantes são aquelas de pequeno comprimento de onda, portanto de altíssima energia e penetrabilidade. Os dois principais tipos são a gama e os Raios X. Elas são bastante eficientes, uma vez que promovem a ionização de átomos, fazendo-os perderem elétrons. Como consequência são gerados radicais livres, extremamente reativos, que podem destruir pontes de hidrogênio, duplas ligações e estruturas em anel. Quando na presença de oxigênio, geram radicais hidroxilas livres, absolutamente tóxicos para as células <sup>7</sup>.

A radiação gama para irradiadores, é originada geralmente a partir de fontes de <sup>60</sup>Co ou <sup>137</sup>Cs. Essas radiações vêm sendo amplamente utilizadas em produtos termolábeis, tais como plásticos, e em alguns tipos de alimentos (frutas, vegetais, alimentos marinhos). Nos alimentos seu uso é interessante, uma vez que inativam enzimas autocatalíticas que participam do processo de degradação natural <sup>7,8</sup>.

Embora o uso das radiações ionizantes vem crescendo, principalmente na indústria alimentícia, o seu uso continua restrito em fitoterápicos e medicamentos, assim, de forma a demonstrar sua potencialidade, realizou-se submeteu-se extrato de *Maytenus ilicifolia* a radiação gama, como forma de controle microbiológico.

## MATERIAL E MÉTODOS

De forma a desenvolver a metodologia para a esterilização de produtos fitoterápicos, foi estabelecida uma parte experimental realizada com soluções devidamente registradas e comercializadas de *Maytenus ilicifolia* (Extrato de *Maytenus ilicifolia* Belem Jardim®), adquiridas de um mesmo lote (três repetições), para se manter as condições de reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados obtidos.

As soluções de *Maytenus ilicifolia*, por triplicado, foram submetidas à irradiação de duas formas distintas. Foi utilizado um irradiador com fonte de <sup>60</sup>Co. Amostras (30ml/amostra) de cada uma das soluções de *Maytenus ilicifolia* M., fo-

ram retiradas e colocadas em frascos de plásticos, devidamente limpos e imediatamente fechados. As amostras foram transferidas ao irradiador e, então, submetidas a doses de radiação gama de 1, 5 e 10kGy conforme metodologia Ralph-Gama <sup>9</sup>. Foi resolvido ainda fazer uma curva crescente de dose de irradiação, para verificar se haveria discrepâncias entre doses significativamente diferentes. Não obstante, a faixa de irradiação de alimentos e produtos médico-cirúrgicos também acontece entre 1-10 kGy. Em seguida, foram desenvolvidos os teste químico e o teste microbiológico, de acordo com a metodologia preconizada para o trabalho.

### Testes Químicos

Amostras de *Maytenus ilicifolia* foram submetidas à análise por cromatografia de camada delgada, com revelação na região do ultravioleta (UV) antes de se proceder à irradiação, para se confirmar a presença dos principais grupamentos químicos existentes e, daí, certificar-se da presença dos princípios ativos e marcadores.

Após a irradiação das soluções de *Maytenus ilicifolia* foi realizada uma nova análise cromatográfica, para verificar se houve interferência da irradiação nos principais constituintes químicos, como formação de produtos de reações secundárias, ou mesmo perda do princípio ativo. Para tanto, foi utilizada a metodologia preconizada por Alberton *et al.* <sup>10</sup>. As amostras foram analisadas em placa de gel de sílica 60, utilizando éter de petróleo/diclorometano (3:1) e éter de petróleo/acetato de etila (9:1) como fases móveis. Como reveladores foram utilizados o timol-sulfúrico e o anisaldeído-sulfúrico por se tratarem de triterpenos. Vale informar que além dessas avaliações, foi realizada uma análise comparativa entre as duas principais falsificações da *Maytenus ilicifolia* -*Zollernia ilicifolia* (Fabaceae) e *Sorocea bompladii* (Moraceae)- de forma corroborativa à avaliação da qualidade da solução de espinheira-santa utilizada. O teste comparativo deu-se pela utilização da metodologia também preconizada por Alberton *et al.* <sup>11</sup>, desta vez sendo utilizados padrões das duas plantas/falsificações, além dos padrões da *Maytenus*.

### Testes Microbiológicos

Foram estabelecidos três testes microbiológicos: o primeiro, desenvolvido com o produto (solução de *Maytenus ilicifolia*) inalterado, logo após sua aquisição; o segundo, realizado com o produto (solução de *Maytenus ilicifolia*) após a

sua contaminação pela inoculação proposital de cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus* (ATCC 12599), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10796), *Escherichia coli* (ATCC 87535), *Salmonella* sp. (ATCC 35987)). O terceiro, com as mesmas soluções inoculadas, submetidas à irradiação nas doses anteriormente descritas, para verificar se a irradiação havia sido eficaz ou não na esterilização de produtos de origem fitoterápica. Na avaliação foram utilizadas cepas padrões de bactérias Gram positiva (*Staphylococcus aureus*), e Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp.), todas pertencentes a coleções de culturas oficiais (ATCC). A escolha destas cepas deu-se por elas representarem os maiores riscos de contaminação de produtos de origem vegetal. Tais cepas, de acordo com a Farmacopéia Brasileira <sup>12</sup>, são tidas como fortemente patogênicas e, portanto, qualquer produto farmacêutico deve estar totalmente isento delas.

A técnica utilizada para o teste microbiológico foi de difusão em meio específico. Assim swabs foram impregnados com a solução de *Maytenus ilicifolia*, separadamente, de acordo com o seguinte esquema metodológico:

#### Semeadura 1

Solução de *Maytenus ilicifolia*, isenta de qualquer manipulação prévia. As soluções 'virgens' de qualquer tratamento foram separadas por triplicata, em tubos de ensaios esterilizados e, então, semeadas em placas de Petri contendo os meios específicos.

#### Semeadura 2

Solução de *Maytenus ilicifolia*, previamente contaminada com as cepas escolhidas (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp.). As soluções contaminadas foram separadas em triplicata, em tubos de ensaios esterilizados e então semeadas de forma confluyente em placas de Petri com os 4 meios específicos.

#### Semeadura 3

Solução de *Maytenus ilicifolia*, previamente contaminada com as cepas escolhidas (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp.) e submetidas à irradiação foram separadas, por triplicata, em tubos de ensaios esterilizados e, então, semeadas em placas de Petri contendo os 4 meios específicos.

A semeadura foi realizada com swabs embebidos com as soluções a serem semeadas. A semeadura foi realizada de maneira confluyente em placas de Petri contendo os seguintes meios específicos, a saber: Agar cetremida: *Pseudomonas*

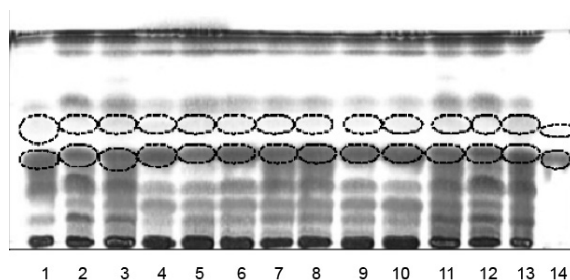
*aeruginosa*; Agar manitol salgado: *Staphylococcus aureus*; Agar verde brilhante: *Salmonella*; Agar MacConkey: *Escherichia coli*. Além de meios específicos para fungos (dextrose 2%).

De cada amostra assim preparada, transferiu-se 100 µL para as placas de Petri em superfície e foi espalhado com alça de Drigalski. Na pesquisa para Coliforme, foi realizado o ensaio através de membrana filtrante. Transferindo 100 µL de cada amostra para 100 mL de água destilada estéril e em seguida o material foi filtrado. Todos os testes foram realizados em triplicata. Após semeadura, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24-48 horas (bactérias) e temperatura ambiente ou a 28 °C (para pesquisa de fungos). Em seguida, foi feita a análise do crescimento microbiológico <sup>13</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

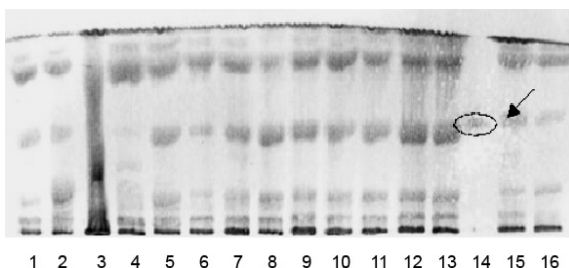
### Fitoquímico

As análises cromatográficas em camada delgada seguindo a metodologia de Alberton *et al.* <sup>10</sup> demonstraram que não houve nenhuma alteração fitoquímica nos constituintes ativos da espinaheira-santa quando submetidos a radiação gama (Fig. 1).



**Figura 1.** Análise Cromatográfica em Camada Fina dos Extratos de *Maytenus ilicifolia* (1-13). Em destaque os compostos friedelina (arriba) e friedenolol (abaixo) usados como padrão (14).

Tais resultados confirmam que a técnica nuclear de irradiação de produtos fitoterápicos tem fortes indícios de ampla utilização, uma vez que a energia não deteriorou ou degradou os constituintes químicos da planta. Além disso, a análise cromatográfica em camada delgada demonstrou que embora a energia nuclear eleve a temperatura do meio reacional e cause reações de hidrólise (radiólise), essas não são suficientemente fortes para adulterarem as características dos constituintes químicos, assim como degradarem os princípios ativos da planta. No tocante à análise frente as principais falsificações das plantas (Fig. 2) *Zollernia ilicifolia* e *Sorocea bompladii*,



**Figura 2.** Análise Cromatográfica em Camada Fina Comparativa dos Extratos de *Maytenus ilicifolia* (1-13), *Zollernia ilicifolia* (15) e *Sorocea bomplandii* (16). Em destaque a betulina (14).

utilizando a metodologia preconizada por Alberton *et al.*<sup>11</sup>, ficou demonstrado que os extratos analisados não continham contaminação pelas outras possíveis espécies botânicas (*Zollernia ilicifolia* e a *Sorocea bomplandii*).

**Microbiológico**

*Ensaio Microbiológico do extrato de M. ilicifolia (sem contaminação prévia)*

Dose de 10 kGy: amostra 1 e amostra 2; dose de 5 kGy: amostra 2 e amostra 3; dose de 1 kGy: amostra 1 e amostra 3; dose de 0 (zero) kGy (controle): amostra 2 e 3.

*Avaliação da contaminação das amostras*

Contagem de heterotróficos - PCA (Contagem Padrão em Placas); Pesquisa de coliformes - Meio Endo (membrana filtrante); Pesquisa de *Salmonella spp* - Meio *Salmonella*; Pesquisa de *Pseudomonas spp* - Meio *Pseudomonas*; Pesquisa de fungos - Ágar Sabouraud.

*Ensaio Microbiológico do extrato de M. ilicifolia (com Contaminação Após a Irradiação)*

Dose de 10 kGy: amostra 1 e amostra 2; dose de 5 kGy: amostra 2 e amostra 3; dose de 1 kGy: amostra 1 e amostra 3; dose de 0 (zero) kGy (controle): amostra 2 e 3.

As Tabelas 1 e 2 demonstram que a radiação gama tem um acentuado efeito bactericida, uma vez que eliminou todos os patógenos inoculados propositalmente nas soluções. Ainda, pela análise das tabelas, observa-se que não há a necessidade da utilização de altas doses de radiação, uma vez que os mesmos resultados foram obtidos, em doses 10 vezes menores que a dose máxima utilizada (10 kGy).

Embora as bactérias tenham comportamento diferenciado e um metabolismo próprio, a radiação gama mostrou-se eficaz sobre todas, independentemente. Um outro fato evidenciado é

**Leitura das Placas - UFC**

Meio de Cultura	D 0/2	D 0/3	D 1/1	D 1/3	D 5/2	D 5/3	D 10/1	D 10/2
Meio Endo	-	-	-	-	-	-	-	-
PCA	-	-	-	-	-	-	-	-
Salmonella	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas	-	-	-	-	-	-	-	-
Fungos leveduriformes	-	-	-	-	-	-	-	-
Fungos filamentosos	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabela 1.** Contagem em inóculo de 100 µL (triplicata) e Doses (kGy). (-) crescimento negativo, (valor numérico) número de colônias- UFC. Não houve crescimento microbiano (coliformes totais e *E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, fungos leveduriformes e fungos filamentosos) em todas as amostras analisadas.

**Leitura das Placas - UFC**

Meio de Cultura	D 0/2	D 0/3	D 1/1	D 1/3	D 5/2	D 5/3	D 10/1	D 10/2
Meio Endo	5	4	-	-	-	-	-	-
PCA	8	10	-	-	-	-	-	-
Salmonella	10	10	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas	8	10	-	-	-	-	-	-
Fungos leveduriformes	-	-	-	-	-	-	-	-
Fungos filamentosos	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabela 2.** Contagem em inóculo de 100µL (triplicata) e Doses (kGY). (-) crescimento negativo; (valor numérico) número de colônias.

que a radiação gama demonstrou-se eficaz em produtos acabados, líquidos, de baixa viscosidade, cujo crescimento bacteriano é propício, ou seja, sua efetividade foi grande em um “pior-caso”.

### CONCLUSÕES

No tocante a irradiação, os resultados demonstrados foram extremamente satisfatórios. A irradiação gama de produtos fitoterápicos líquidos (soluções) confirmou seu poder bactericida e fungicida. Foi percebido ainda que não houve alteração dos principais constituintes químicos em especial dos princípios ativos, o que permite a difusão da técnica assim como a sua extrapolação para outras matrizes vegetais. Quanto a dose, foi observado que doses de 1 KGy obtiveram o mesmo efeito que doses de 10 KGy, sob as mesmas condições, alerta-se para a necessidade de estudos mais aprofundados para a detecção do limiar de dose necessário para a esterilização de produtos fitoterápicos. A mudança no pH das soluções, não representou um risco a sua integridade e tal fato deve ser reduzido em doses menores. A diminuição da taxa microbiana sem alteração fitoquímica representa uma potencialidade enorme para uma técnica de revalidação de lotes de fitoterápicos, entretanto estudos mais aprofundados e com uma gama maior de matrizes vegetais devem ser conduzidos de forma a corroborar o explicitado. No tocante a identificação química por cromatografia de camada fina, esta se demonstrou bastante eficaz e eficiente, entretanto de forma a obter dados mais robustos e com um quantidade maior de prospecções, recomenda-se análises mais específicas.

### REFERÊNCIAS

1. Lorenzi, H. & F.J.A Matos (2002) “*Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas*” Instituto Plantarum, São Paulo. Vol. 1, págs. 120-2.
2. Mossi, A.J., R.L. Cansian, A.Z. Carvalho, C. Dariva, V.J. Oliveira & M. Mazutti (2004) *Fitoterapia* **75**: 168-78.
3. Cunha, S.C. (2003) “*Ação Farmacológica da espinheira santa: usos e precauções*” Departamento de Medicina Veterinária de Lavras - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.
4. Azevedo, A.C.P. (2005) FIOCRUZ. Escola Nacional de Saúde Pública-CESTEH, 2005. [on line], disponível na Internet via WWW:URL: <http://www.biossegurançahospitalar.com.br/files/raiox.doc>. [Arquivo capturado em 10 de Julho de 2005].
5. Teixeira, G.(2002) *Revista Brasil Nuclear* **25**: 26-8.
6. Giurlandi, S. (2001) *Revista Brasil Nuclear* **23**: 1-20
7. Farmacopéia Brasileira (1988) “*Esterilização por radiação*”. Editora Atheneu, 4 ed, São Paulo, Parte I.
8. Figawa (1998) *Arbeitskreis UV Wasserbehandlung*. Comunicado N° 20. Alemanha, **20**: 1-15.
9. Colaço, W. & R.S. Oliveira (2006) *Revalidação e Controle Microbiológico por Radiação Gama*; Patente de privilégio de inovação PI 0604099-3.
10. Alberton, M.D.; Falkenberg, D.B.; Falkenberg, M.B (2002) *Revista Brasileira de Farmacognosia* **12**: 11-13.
11. Alberton, M.D.; Falkenberg, M.B. & Falkenberg, D.B. (2002) *Revista Brasileira de Farmacognosia* supl: 9-11.
12. Farmacopéia Brasileira (1988) “*Testes de segurança biológica*”. Editora Atheneu, 4 ed, São Paulo, Parte I.
13. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1993) “*Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically*”. Approved Standard M7-A3 3 Ed, . Pennsylvania, EUA , Vol. 13, págs. 1-13 e 31
14. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2001) “*Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*” Information Supplement M2-A711 e M7-A5, Ed. Pennsylvania, EUA, Vol. 21 págs. 48-53
15. Patente N° PI 0604099-3 . Autor Ralph Santos Oliveira (2006). Depositada no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual do Brasil.